

# 番木瓜环斑病毒在番木瓜原生质体中复制的初步研究

陈枝楠<sup>\*\*</sup> 郑冠标<sup>✓</sup> 林孔勋 范怀忠

(华南农业大学植保系, 广州, 510642)

5432.41

**提要** 以1.0%的 Macerozyme R-10, 1.5%的 Cellulose Onozuka R-10, 0.45mol/L 的甘露醇和 pH5.4 的培养基作为分离番木瓜原生质体的最佳条件, 得到了高活力和高产量的原生质体。PRV-Ys(Vb) 株系和聚鸟氨酸(PLO, MW200000) 分别以 1 $\mu$ g/ml 的最终浓度接种番木瓜原生质体(5 $\times$ 10<sup>6</sup> 原生质体/ml), 成功地建立了 PRV-番木瓜原生质体体系。

对于 PRV 在番木瓜原生质体中复制的行为动态差异, 本实验研究了 PRV-Ys 和 PRV-Vb 两株系, 三个不同抗性梯度的番木瓜原生质以及不同培养温度之间相互作用, 相互影响的关系, 从而认为 PRV 不仅能在寄主品种 *Carica papaya* var. F1 和 *C. papaya* var. Tw-5 而且还能在非寄主 *C. stipulata* 的原生质体中进行增殖, 环境温度不仅能影响 PRV 在番木瓜细胞中的增殖能力, 而且还能影响植株细胞本身的生活能力和抗 PRV 侵染的能力; PRV-Ys 和 PRV-Vb 两株系在 *C. papaya* var. F1 原生质体中的增殖潜伏期和增殖曲线没有明显差异。

**关键词:** 抗性表达 病毒-原生质体体系 单细胞侵染模型

番木瓜; 环斑病毒; 原生质体; 复制

为了全面地了解番木瓜单细胞和愈伤组织对番木瓜环斑病毒(Papaya Ringspot Virus, PRV) 侵染的抗性表达机制及其与成株抗性表达机制之间存在差异性<sup>[1-5]</sup>, 为番木瓜个体(单细胞或愈伤组织) 抗病性的筛选提早供期鉴定和诊断的侵染动力学指标<sup>[6-9]</sup>, 建立番木瓜原生质体 PRV 单细胞侵染模型(Model of Single-Cell Infection)<sup>[9-10]</sup> 是一个重要途径。

## 材料与方 法

### 1 材料

番木瓜野生种 *Carica Stipulata* (对 PRV 免疫) 来自美国夏威夷国家物种保藏中心, 由 Mike Nago 教授提供; 栽培种 *C. papaya* var. Tw-5 (对 PRV 耐病) 由台湾凤山热带园艺试验所柯文雄教授提供; 栽培种 *C. papaya* var. F1 (对 PRV 高度感病) 由广州河南园艺场提供。

番木瓜环斑病毒 PRV-Ys 株系, PRV-Ys 株系兔抗血清及 PRV-Ys RNA cDNA 分子探针均由华南农业大学植物病毒研究室提供。

### 2 方法

#### 2.1 原生质体的分离和纯化

原生质体的分离: 分离原生质的酶混合溶液由原生质体基本液体培养基和酶制剂混合组成。基本培养基组成如下: 0.2m mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1m mol/L KNO<sub>3</sub>, 1m mol/L KI, 0.01 $\mu$  mol/L CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 10m mol/L CaCl<sub>2</sub>,

本文于 1990 年 10 月 4 日收到, 1992 年 8 月 19 日修回。

- 国家教委自然科学基金资助项目
- 现在深圳动植物检疫局工作, 邮编 518010

6.6m mol/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 m mol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1m mol/L 甘氨酸, 100 $\mu$ g/ml 羧苄基青霉素 (Carbenicillin) 和 0.45mol/L 甘露醇 (pH5.5)。溶解在培养基中的酶制剂最终浓度果胶酶 Macrozyme R-10 为 1.0%, 纤维素酶 Cellulase Onozuka R-10 为 1.5%<sup>[2,12]</sup>。

番木瓜三个品种(种)的实生苗盆栽在防虫隔离温室。苗龄四十天后, 采其顶端新展开叶片, 蒸馏水冲洗后用硅藻土进行表面摩擦<sup>[6,7,11]</sup>, 蒸馏水冲洗 3—5 次后置室温下凉干。1.5% 次氯酸钠表面消毒 20—30 分钟, 无菌水冲洗 3—5 次后用剪刀除去叶脉, 所得叶片剪成 1—2mm 宽的细丝<sup>[2]</sup>浸入到分离原生质体用的混合酶溶液中, 在 28℃ 的黑暗条件下静置 8 小时游离原生质体。番木瓜叶片和混合酶溶液的比例是 1:20(W/W)。

原生质体的纯化, 采用等密度离心法<sup>[7,12]</sup>纯化原生质体。在 10ml 容量的带帽离心管中盛 8ml 20% Percoll, 在其界面上轻轻加入 2ml 浓缩的原生质体悬浮液, 100 $\times$ g 水平离心 10 分钟后用吸管吸出原生质体带, 0.45 mol/L 甘露醇—10m mol/L  $CaCl_2$  溶液离心洗涤三次。最后把离心管底的原生质体悬浮液在基本培养基中, 制备成浓度为  $1 \times 10^6$  细胞/ml 的原生质体悬浮液, 以备病毒接种之用。

## 2.2 病毒接种和原生质体的取样分析

接种用的病毒是自然界中的优势株系 PRV-Ya 和 PRV-Vb。原生质体进行如下三个接种处理:

2.2.1 PRV-Ya 接种上述三个不同抗性品种(种)的原生质体<sup>[11-13]</sup>研究不同抗性品种(种)的原生质体对 PRV 增殖的影响。

接种过程为: 1 ml PRV 悬浮液 (10 $\mu$ g/ml), 1ml 聚鸟氨酸 (PLO, MW200000) 溶液 (10 $\mu$ g/ml) (上述两溶液均含有 0.45mol/L 甘露醇和 10m mol/L  $CaCl_2$ , pH5.4) 和 8ml 原生质体基本培养液均匀混合, 28℃ 恒温箱中孵育 20 分钟, 加入 10ml 原生质体悬浮液。混合均匀后置 28℃ 恒温箱中孵育 30 分钟。150 $\times$ g 离心 5 分钟, 沉淀的原生质体用 0.45mol/L 甘露醇—10m mol/L  $CaCl_2$  溶液离心洗涤三次 (150 $\times$ g, 5 分钟), 再悬浮在 10ml 基本培养基中进行培养<sup>[7,10,12]</sup>。

取样方法, 原生质体接种后, 在 28℃ 光培养箱中进行 12 小时黑暗和 12 小时光照 (2000lux) 处理, 培养 0、8、12、24、48、72 和 96 小时后, 分别取出 1.4ml 培养物置 Eppendorf 管中, 在 0℃ 冰箱中贮存。以 1ml 无菌水代替 1ml PRV 悬浮液接种原生质体 (方法同上) 作为对照处理。

2.2.2 PRV-Ya 接种栽培品种 *C. papaya* var. F1 的原生质体, 在不同的温度下培养<sup>[7,11]</sup>, 研究温度对原生质体中病毒增殖的影响。

接种后的原生质体悬浮液分成五等份 (每份 2ml) 分别置于 10、22、28、35 和 40℃ 恒温箱中培养, 光照, 处理, 取样方法和对照处理同上。

2.2.3 以 PRV-Ya 和 PRV-Vb 两株系分别接种栽培品种 *C. papaya* var. F1 的原生质体, 作为不同株系在原生质体中增殖潜伏期的比较研究<sup>[2,3,7]</sup>。在 28℃ 温度下培养。

上述三种处理的原生质体在取样的同时, 进行原生质体浓度检测和形态观察, 以分析培养过程中对原生质体数量增减和形态变化的影响。

## 2.3 原生质体中的病毒和病毒 RNA 的提取

病毒的提取, 采用多次冻融 (Thawing), 加热法<sup>[1,7,12]</sup>提取原生质体中的病毒<sup>[7,17]</sup>。在 1.4ml 样品中取出 0.7 ml 分装到 Eppendorf 管中, 10000 $\times$ g 离心 2 分钟后, 倒去上清液, 沉淀用 20 $\mu$ l 0.025mol/L 磷酸钾缓冲溶液 (含 0.01 mol/L EDTA, pH7.5) 悬浮, 置 -30℃ 冰箱中冷冻 24 小时后在室温下融化, 水中煮沸 3 分钟后, 冻融, 沸水中煮沸 1 分钟, 重复三次后, 加入等量氯仿, 充分混合, 10000 $\times$ g 离心 10 分钟, 小心收集水相以检测病毒含量<sup>[2,7]</sup>。

病毒 RNA 的提取: 1.4ml 样品用于提取病毒的 0.7ml, 剩下的 0.7ml 溶液以 10000 $\times$ g 离心 2 分钟, 沉淀用 100 $\mu$ l 热缓冲溶液 (0.05 mol/L Tris·Cl pH9.0, 2% SDS, 2%  $\beta$ -巯基乙醇和 15% 甘油<sup>[1,13,14]</sup>) 悬浮。同样采取多次冻融, 加热方法处理原生质体, 得到冻融溶液。加入等量的酚/氯仿 (23:1) 溶液进行多次抽提<sup>[2,14]</sup>。加入 0.1 倍体积 2.5mol/L NaAc 和 2.5 倍体积乙醇沉淀 RNA (-20℃, 2 小时), 10000 $\times$ g 离心 10 分钟沉淀用 75% 乙醇离心洗涤三次, 冷冻真空干燥。抽干的 RNA 悬浮于 20 $\mu$ l TE (pH7.6) 中, 待检测 PRV-RNA 的含量。

#### 2.4 原生质体中病毒和病毒 RNA 含量的检测

病毒检测方法, 上述三个处理的病毒提取样品各取 5 $\mu$ l 点样于硝酸纤维素滤膜(NCM)上, 根据陈枝楠等<sup>[2]</sup>建立的检测 PRV 病毒粒子的间接 Dot-ELISA 检测 PRV 的含量。

病毒 RNA 的检测方法, 上述三个处理的病毒 PRV 提取样品各取 5 $\mu$ l 点样于 NCM 上, 用陈枝楠等<sup>[3]</sup>合成的 PRV<sup>+</sup>cDNA 分子探针进行分子杂交, 分析放射自显影图象, 检测 PRV-RNA 的含量。

## 结 果

本研究以 1% 的 Macerozyme R-10, 1.5% Cellulase Onozuka R-10, 0.45 mol/L 的甘露醇渗透稳定剂和 pH5.4 的培养基作为分离番木瓜原生质体的最佳条件, 得到了高活力和高产量的原生质体( $1 \times 10^6$  原生质体/ml), 在 PRV-Ys(Vb) 株系和聚鸟氨酸(PLO, MW200000) 分别以 1 $\mu$ g/ml 的最终浓度接种番木瓜原生质体( $5 \times 10^6$  原生质体/ml) 时, 成功地建立了 PRV 番木瓜原生质体体系。

#### 1 PRV-YS 在不同抗性品种(种)原生质体中的复制

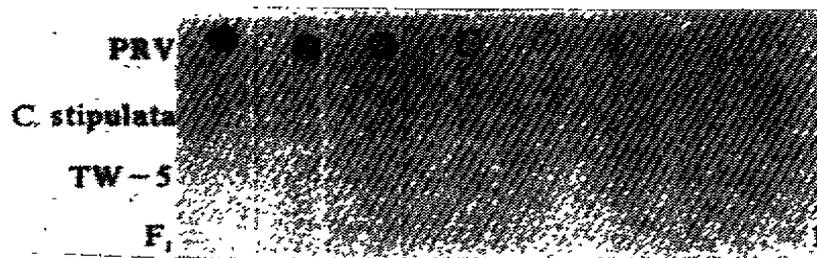


图 1 PRV-Ys 在不同抗性番木瓜品种(种)原生质体中的复制

Fig. 1 Replication of PRV in protoplasts from various resistant papaya varieties (specise)

表 1 PRV-Ys RNA 在原生质体中的复制

Table 1 Replication of PRV-RNA in protoplasts

番木瓜品种(种) papaya varieties (species)	培养时间(小时) culture time (hs)							
	CK	0	8	12	24	48	72	96
C. stipulata	-	±	±	+	+	++	+++	++++
C. papaya var. Tw 5	-	±	±	±	+	++	++	+++
C. papaya var. F1	-	±	±	±	+	++	++	+++

“-”阴(negative), “+”阳性(positive), ±, +, ++, …, ++++ 表不同放射自显影强度(indicating the various active strength of autoradiograph)

接种后的原生质体在 28℃ 温度下培养不同时间, PRV-Ys 病毒颗粒在原生质体中消长变化从图 1 的间接 Dot-ELISA 检测结果可以看出, PRV-Ys 在三个不同抗性品种(种)的原生质体中都是接种培养 48 小时后才检测到 PRV-Ys 病毒粒子的存在, 而且随着培养时间的延长, 原生质体中病毒含量增加。在三个不同抗性品种(种)的原生质体中 PRV-Ys RNA 的增殖从表

1的 $P^{Ys}$  cDNA分子探针杂交自显影强度比较可看出,在12小时以前RNA较少,在24小时以后RNA复制量则明显增加。同样随着培养时间的延长,原生质体中PRV-RNA的含量增大。

## 2 不同培养温度对PRV-Ys在原生质体中复制的影响

培养温度对PRV-Ys增殖的影响:间接Dot-ELISA检测结果(图2)表明,不同培养温度对PRV-Ys在原生质体中的增殖有明显的影响。在10℃下培养的原生质体几乎检测不到任何PRV-Ys粒子的存在;在22℃下培养48小时可检测到;在28℃下只要培养24小时就可检测到,而且随着培养时间的延长,病毒含量愈高。这说明低温抑制了PRV-Ys在原生质体中的增殖量和速率。当培养温度升高至35℃和40℃时,分别在72和96小时后才可检测到PRV-Ys的存在,说明了高温也同样会影响病毒在原生质体中的增殖量和速率。由此可见28℃是病毒在原生质体中增殖的最佳培养温度。

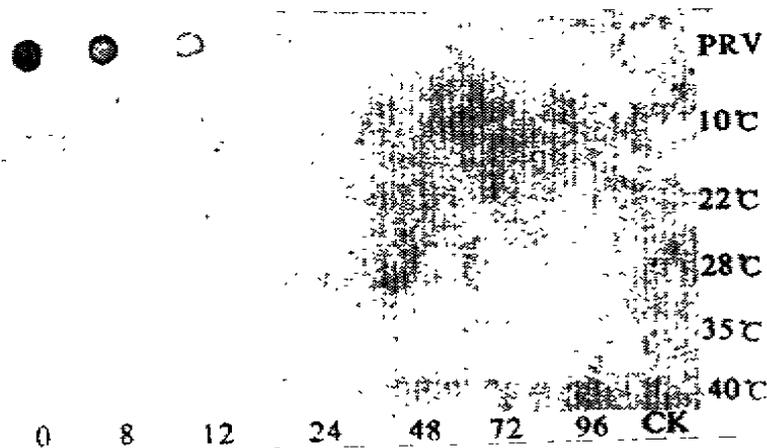


图2 温度对原生质体中PRV增殖的影响

Fig. 2 Effect of temperature on multiplication of PRV in protoplasts

培养温度对PRV-Ys RNA在原生质体中复制的影响: $P^{Ys}$  cDNA分子探针检测原生质体中的PRV-Ys RNA含量的结果(图3)表明,在10℃下培养0、24和48小时后能检测PRV-RNA的存在。其它四个温度条件下培养的原生质体,在0到96小时都能检测到PRV-Ys RNA的存在,而且随着培养时间的延长,病毒RNA含量增加。从而也表明低温对病毒增殖的影响较高温的影响效果要大。

培养温度对接种原生质体数量和形态的影响:五个不同培养温度对接种原生质体在0到96小时培养过程中数量和形态的影响分别见表2和图4。随着培养温度的升高,原生质体的数量在减少,而且原生质体的形态由原来的圆形变成皱缩,叶绿体消失。从而说明培养温度和病毒的感染影响了原生质体的生活能力和稳定性。

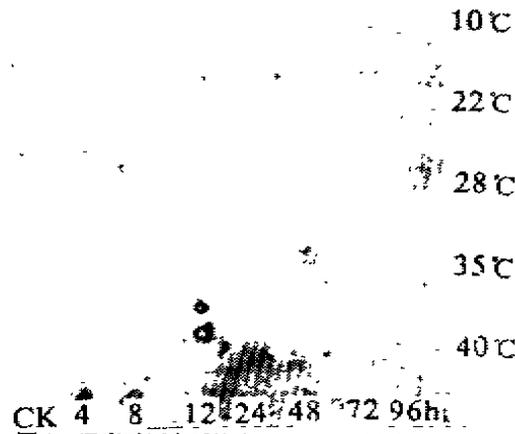


图 3 温度对原生质体中 PRV-RNA 增殖的影响  
Fig. 3 Effect of temperature on multiplication of PRV-RNA in protoplasts

表 2 温度对接种原生质体数量的影响

Table 2 Effect of temperature on amount of protoplasts inoculated

温度(°C) Temperature	时间(hr) Time (hr)	
	0	96
10	$1 \times 10^6$	$8.3 \times 10^5$ <sup>a</sup>
22	$1 \times 10^6$	$7.6 \times 10^5$ <sup>a</sup>
28	$1 \times 10^6$	$6.5 \times 10^5$ <sup>a</sup>
35	$1 \times 10^6$	$4.5 \times 10^5$ <sup>b</sup>
40	$1 \times 10^6$	$2.1 \times 10^5$ <sup>c</sup>

p=0.01, 数据为三次重复平均值 (Figures is average of three repeats)

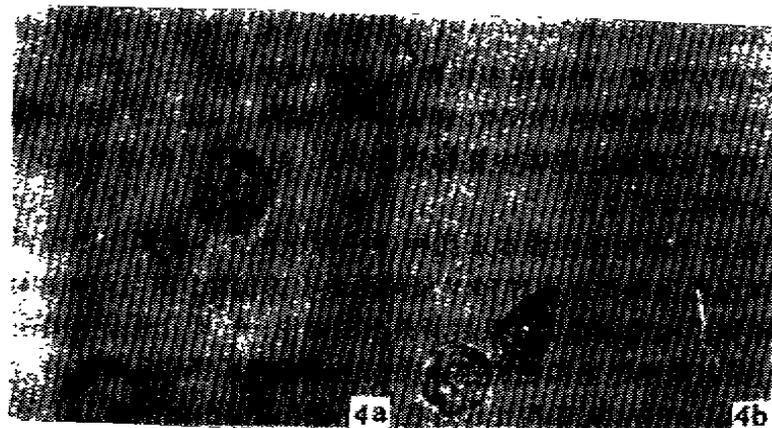


图 4 接种前(左)后(右)原生质体形态变化  
Fig. 4 Change of protoplast morphology, non-inoculated (left), inoculated (right)

### 3 不同株系在原生质体中的增殖曲线

PRV-Ys 和 PRV-Vb 两株系在 *C. papaya* var. F1 的原生质体中的增殖经间接 Dot-ELISA 检测结果(图 5)表明,两株系都是在接种培养 48 小时后被检测到而且都是随着培养时间延长,病毒含量增加。从图 6 可以看出两株系在原生质体中的增殖潜伏期相同,而且其增殖曲线也没有明显差异。

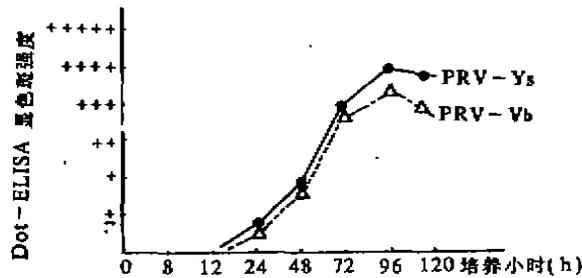


图 5 PRV-Ys 和 PRV-Vb 在原生质体中的增殖曲线

Fig. 5 Multiplication curve of PRV-Ys and Vb strains in protoplasts

Conover 和 Litz 等<sup>[7,10]</sup>报道,野生种 *C. stipulata* 带有显性抗 PRV 单基因,属于 PRV 的非寄主植物,而 *C. papaya* 的 F1 和 Tw-5 栽培品种对 PRV 的侵染分别表现高度感病和耐病<sup>[6]</sup>,属于寄主植物。根据 Adams(1988)等<sup>[1,2,3,14,16]</sup>认为病毒在原生质体中个体行为的动态差异性可能与成株植物抗性之间存在着一种潜在有机联系,本研究选用的三个不同抗性梯度的番木瓜品种(种)和自然界中占明显优势的 PRV-Ys 和 PRV-Vb 两株系,组成了不同的单细胞侵染模型,初步研究了 PRV 在番木瓜原生质体中复制的差异性,这对于了解番木瓜抗感 PRV 病毒的侵染复制机制有一定的指导意义。

PRV-Ys 株系在三个不同抗性番木瓜品种(种)的原生质体中都能增殖,说明了野生种 *C. stipulata* 的原生质体没能反映其成株对 PRV 侵染所具有的抗性。这与 Motoyoshi 等<sup>[9,10,13,15,16]</sup>在分析其它大多数植物原生质体病毒体系后所得出的结论——即几乎所有寄主植物的原生质体都能被病毒感染,而有些非寄主植物的原生质体也能被病毒感染是一致的。这可能是因为没有细胞壁的原生质体与 PRV 病毒相互作用在行为动态差异的时间指标上不能完全反映番木瓜植物组织或成株与 PRV 相互作用、相互识别的机制,从而失去了组织或成株抗病毒侵入、复制等抗性机制的缘故<sup>[2,3,5,7,6]</sup>。

自然界中番木瓜植株在低温(低于 20℃),适温(26—28℃)和炎夏高温(34℃以上)等不同温度条件下,分别表现为严重“鸡爪形”,典型环斑和轻花叶等症状。这种植株症状的表现随环

境温度变化而变化的现象<sup>[7,17,18]</sup>,可以从本研究中不同培养温度对 PRV 在番木瓜原生质体中复制的影响结果得以解释。即低温虽较严重地影响了 PRV 在细胞内的增殖,但更严重地影响了番木瓜植株的抗病能力,因而番木瓜叶片表现严重“鸡爪形”症状;适宜的温度虽有利于植株的生长,但更有利于 PRV 在细胞内的大量快速增殖,因而植株表现典型的花叶和环斑症状;高温虽不太影响番木瓜植株旺盛生长,但却较严重抑制了 PRV 在细胞内的增殖量和速率,因而植株表现症状减轻或隐症。

因此,根据上述结果本研究可以初步得出如下结论:

- 1 PRV-Ys 不仅能在寄主植物品种 *C. papaya* var. F1, *C. papaya* var. Tw-5 而且还能在非寄主植物 *C. stipulata* 的原生质体中进行增殖。
- 2 温度不仅能影响 PRV 在番木瓜单细胞原生质体中的增殖能力,而且还能影响寄主植物细胞和寄主植物的生活能力,从而影响其抗病能力。
- 3 PRV-Ys 和 PRV-Vb 的增殖潜伏期和增殖曲线没有明显的差异。

### 参 考 文 献

- 1 Salle A, Lones R A C, Coutts R H R. Expression of potato virus resistance gene Rx in potato leaf protoplasts. *J Gen Virol*, 1986, 67(11): 2341—2345
- 2 Barnett A, Hammond J, Lister R M. Limited infection of cereal leaf protoplasts by barley yellow dwarf viurs. *J Gen virol*, 1981, 57(3): 397—401
- 3 Deverall B J, Bailey J A. *The Dynamics of Host Defence*. Australia: Academic Press, 1983
- 4 Loebenstein G, Gera A. Inhibitor of viurs replication released from tobacco mosaic viurs-infected protoplasts a local lesion-responding tobacco cultivar. *Virology*, 1981, 114(1): 132—139
- 5 Van der Plank J E. *Host-Pathogen Interaction in plant Disease*. New York: Academic Press, 1987
- 6 朱西儒, 范怀忠, 黄鸿枢. 番木瓜环斑病毒 (PRV) 侵染寄主叶片的电子显微镜观察. *植物病理学报*, 1991, 21(1): 78—79
- 7 陈枝楠. 番木瓜环斑病毒检测新技术的建立及其在病毒-原生质体体系探索中的初步应用 [博士学位论文], 广州: 华南农业大学, 1990
- 8 Conover R A, Litz R E. Progress in breeding papaya with tolerance to papaya ringspot viurs. *Proc Fla Hort Soc*, 1987, 91(1): 182—184
- 9 Keen N T. Novel approaches to improved disease resistance in plants. In: *Beltsville Symposium X, Biotechnology for Solving Agricultural Problems*. May, 1985: 5—9
- 10 Aoki S, Takebe I. Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid: *Virology*, 1969, 39: 439—448
- 11 Beier H, Bruering G. The use of an abrasive in the isolation of cowpea leaf protoplasts which supported the multiplication of cowpea mosaic virus. *Virology*, 1975, 64(2): 272—276
- 12 Liu C S, Yang J S. Isolation and culture of papaya protoplasts (Taiwan). *Plant Physiol*, 1983, 72(1)(Suppl): 144
- 13 Takebe I. Protoplasts in the study of plant virus replication. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 11, Fraenkel Conrat H, ed., New York: Plenum Publishing, 1977, 237—259
- 14 Coutts R H, Wood K R. Inoculation of leaf mesophyll protoplasts from a resistant and susceptible cultivar with cucumber mosaic virus. *FEMS Microb Lett*, 1977, 121: 342
- 15 Maule A T, Bealton M L, Wood K R. Resistance of cucumber protoplasts to cucumber mosaic virus a comparative study. *J Gen Virol*, 1980, 51: 271—279
- 16 Motoyoshi F, Oshima N. Infection with tobacco mosaic virus of leaf mesophyll protoplasts from susceptible and resistant line

- of tomato. *J Gen Virol*, 1975, 29 : 81—91
- 17 Purcifull D E, Gonsalves D. Papaya Ringspot Virus. No 272. In : Description of Plant Virus, Commonw Mycol Inst Assoc Appl Biol Kew, Surrey, England, 1984
- 18 Wang D N. Screen of papaya varieties for ringspot virus tolerance. *J of Agri Res of China*, 1982, 31(2) : 162—168

## Preliminary Research on Replication of Papaya Ringspot Virus (PRV) in Papaya Protoplasts

Chen Zhinan    Zheng Guanbiao    Lin Kungxun    Faan Hweichung

(Plant Protection Department, South-China Agriculture University, Guangzhou, 510642)

A concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml of high viable protoplasts was obtained by using the following optimal concentrations for isolating papaya mesophyll cell protoplasts: 1. 0% Macerozyme R-10, 1.5% cellulase Onozuka R-10 and 0.45 mol/L mannitol in the medium (pH5.5). The inoculation was successfully carried out by exposing  $5 \times 10^5$  cells/ml of the protoplasts to the final mixture of 1  $\mu$ g/ml PRV-Ys (or Vb) strains and 1  $\mu$ g/ml poly-L-ornithine (MW200000).

The preliminary results of the studies on behavior kinetics of PRV in protoplasts isolated from various resistant papaya varieties (species) and the effect of the culture temperature on the replication of PRV in protoplasts isolated from *Carica papaya* var. F1, showed that PRV-Ys strain could multiply not only in the protoplasts of the host plant, but also in those of non-host one. In the present study it was also found that the culture temperature affect not only the extent of multiplication of PRV in protoplasts, but also the viability of protoplasts infected and the response of resistance to the infection of the intact plants by PRV. Otherwise, the replication incubation periods of PRV-Ys and PRV-Vb strains in protoplasts isolated from *C. papaya* var. F1 had not distinct difference.

**Key words:** Resistance expression    Virus-protoplast system    Model of single-cell infection